فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۱۷- ۱۲۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد بیوپلیمر پلی‌هیدروکسی‌آلکانوآت از خاک‌های آلوده به نفت منطقه مسجد سلیمان و بهینه‌سازی شرایط تولید

فرشید کفیل زاده*: دانشیار زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران، kafilzadeh@jia.ac.ir
ارمغان پرتو: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران، armaghan.parto@gmail.com
حسین معتمدی: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، hhmotamedi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پلی هیدروکسی‌آلکانوآت (PHA) از جمله پلیمرهای زیست تخریب پذیر است که توسط باکتری‌ها تولید می‌شود و کاربرد آن به‌جای پلاستیک‌های پتروشیمیایی می‌تواند موجب کاهش آلودگی محیط زیست شود. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد PHA از ناحیه نفتی مسجدسلیمان، تعیین درصد PHA تولیدی توسط این باکتری‌ها، تعیین شرایط بهینه دما، اسیدیته، غلظت و نوع منابع کربن و نیتروژن بر میزان سنتز PHA و امکان استفاده از پسماندهای نفتی به عنوان بستر ارزان قیمت کربن برای سنتز PHA توسط باکتری‌های جداشده است.

مواد و روش‌ها: در ابتدا ۹ نمونه خاک از چهار ناحیه آلوده به نفت مسجدسلیمان برداشت شد و غربال‌گری اولیه با استفاده از محیط MSM در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. جدایه‌ها از نظر تولید PHA با استفاده از رنگ آمیزی سودان سیاه تایید و با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و تعیین توالی *16S rRNA* تعیین هویت شدند. بهینه‌سازی دما، اسیدیته، منابع کربن و نیتروژن برای رشد باکتری‌ها نیز انجام شد.

نتایج: در این پژوهش، ۱۱ جدایه مولد PHA شناسایی شد که از بین آن‌ها جدایه MIS-1 با ۵۸/۵۲۲ درصد وزن خشک سلولی بیش‌ترین میزان PHA را تولید می‌کرد. این جدایه بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و بررسی توالی *16S rRNA* با ۹۵ درصد شباهت متعلق به گونه *Pseudomonas aeruginosa* تشخیص داده شد. به‌علاوه نتایج آزمون‌های بهینه‌سازی نشان داد که این جدایه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷، گلوکز به عنوان منبع کربن، سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن و در نهایت، غلظت ۱۰ گرم بر لیتر منبع کربن و غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر منبع نیتروژن بالاترین میزان PHA را سنتز می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که خاک های آلوده به نفت منطقه مسجدسلیمان به علت آلودگی طولانی مدت و میزان کربن بالا، زیستگاه مناسبی برای غربال‌گری باکتری‌های مفید از جمله مولد PHA هستند.

واژه‌های کلیدی: پلی هیدروکسی آلکانوآت (PHA)، محیط پایه نمکی (MSM)، *سودوموناس آئروژینوزا*، مسجد سلیمان

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

امروزه مصرف پلاستیک‌های پتروشیمیایی به علت دوام طولانی مدت و اثرات مضرشان در محیط زیست سبب ایجاد نگرانی‌های عمومی شده‌اند. به همین علت تمایل به استفاده از مواد تجزیه پذیر زیستی برای ساخت پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر زیستی افزایش یافته است. از بین مواد تجزیه‌پذیر نام‌برده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوآت[1] (PHA) کاربرد بیشتری دارد (۱). PHA توسط میکروارگانیسم‌های مختلف تحت شرایط کاهش عناصر غذایی ضروری مانند: نیتروژن، فسفر، گوگرد، اکسیژن مولکولی و یا منیزیم در حضور مقادیر در خور توجهی از کربن ساخته می‌شود و به شکل گرانول‌هایی در سیتوپلاسم سلول باکتریایی ذخیره می‌شود (۲).

در حدود ۳۰۰ گونه باکتری مختلف این پلیمر تخریب پذیر زیستی و سازگار با محیط زیست با وزن مولکولی ۲×۱۰^{۵} و ۳×۱۰^{۶} دالتون را تولید می‌کنند (۳). PHA یکی از مهم‌ترین انواع پلیمرهای زیستی است که نخستین بار در *Bacillus megaterium* کشف شد و تا کنون بیش از ۱۵۰ جزو مونومری متفاوت از آن یافت شده است (۴). میزان سنتز PHA به نوع باکتری، شرایط رشد آن، بستر مناسب، منبع کربن مناسب و نسبت بالای کربن به نیتروژن بستگی دارد. باکتری‌هایی که در خاک مناطق آلوده وجود دارند به علت افزایش آلودگی در این محیط‌ها از آلاینده‌ها به عنوان غذا بهره برده و میزان زیادی PHA تولید می‌کنند (۳). PHA تولیدی باکتری‌ها در صنایع، فارماکولوژی، پزشکی و تولید زیست سوخت‌ها کاربرد دارد. هزینه بالای تولید PHA که مربوط به بستر و منبع کربن آن است موجب شده که تولید PHA با پیشرفت کندی همراه باشد. بنابراین، نخستین قدم برای تولید میزان مناسب PHA استفاده از محیط کشت ارزان قیمت و فرآیندهای تخمیری مناسب است. به‌همین علت از منابع ارزان قیمت کربن نظیر پساب‌ها، روغن‌های گیاهی، اسیدهای چرب، آلکان‌ها، کربوهیدرات‌ها و مواد زاید کشاورزی، شیره نیشکر، ملاس چغندر، زباله‌های کشاورزی و صنعتی، روغن‌ها، پسماند روغن‌های سرخ کردنی و روغن‌های نباتی تصفیه نشده استفاده می‌شود (۵). منطقه مسجدسلیمان نخستین منطقه نفت خیز کشور است که با توجه به سابقه طولانی کشف و استخراج نفت از آن دارای آلودگی طولانی مدت است. بنابراین، باکتری‌های ساکن این منطقه گزینه‌های مناسبی برای تولید PHA به نظر می‌رسند. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد PHA از خاک منطقه نفتی مسجد سلیمان، بهینه‌سازی شرایط تولید بهترین جدایه و امکان استفاده از پسماندهای نفتی به‌عنوان بستر ارزان قیمت کربن برای سنتز PHA توسط باکتری‌های جداشده است. از سوی دیگر تاکنون پژوهشی پیرامون این موضوع بر روی خاک آلوده به نفت در مسجدسلیمان انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: به منظور نمونه‌برداری از خاک آلوده به نفت، سه محل مربوط به چاه نفت مهار شده و یک محل در واحد بهره برداری برای نمونه‌برداری به شرح زیر انتخاب شد:

محل اول به نام چاه سی برنچ، شامل دو ایستگاه؛ محل دوم به نام چاه شماره ۱۳۲، شامل دو ایستگاه؛ محل سوم به نام چاه شماره ۱۲۷، شامل دو ایستگاه و محل چهارم به نام واحد شماره‌ی ۹ شامل سه ایستگاه است (در مجموع ۹ نمونه خاک). در تمامی ایستگاه‌های یاد

شده نمونه‌برداری از یک سانتی‌متری سطح رویی خاک انجام شد و هر یک از نمونه‌ها به شکل جداگانه در ظروف استریل مخصوص نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند.

غربال‌گری باکتری‌های مولد PHA: برای جداسازی باکتری‌های تولید کننده PHA ازمحیط پایه نمکی[۲] استفاده شد (۶) و به منظور تشخیص تولید PHA از رنگ‌آمیزی سودان سیاه استفاده شد (۷).

تعیین میزان درصد PHA تولیدی: برای آماده کردن بیومس سلولی، ابتدا محیط کشت باکتری در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رسوب حاصل از این عمل در دمای ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و وزن آن با استفاده از ترازو محاسبه شد (۸). سپس، استخراج PHA با استفاده از روش سدیم هیپوکلریت و کلروفرم انجام، وزن آن توسط ترازو سنجیده و درصد PHA تولیدی توسط هر جدایه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۹):

درصد PHA تولیدی = (جرم PHA برحسب گرم × ۱۰۰) / جرم بیومس بر حسب گرم

شناسایی باکتری‌های تولید کننده PHA: جدایه‌های تولید کننده PHA ابتدا بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی شامل رنگ آمیزی، آزمون‌های آنزیمی و آزمون‌های بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی شد. سپس، با استفاده از روش مولکولی توسط کیت استخراج شرکت سیناژن DNA آن‌ها استخراج و به منظور بررسی کیفیت و غلظت DNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر از ژنوم مورد نظر بر روی ژل آگاروز یک درصد با ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه ژل الکتروفورز شد. عکس ژل پس از الکتروفورز توسط دستگاه ژل داک تهیه شد. واکنش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای FD1 و RP1 انجام شد (جدول‌های ۱ و ۲) و با بردن بخشی از مخلوط واکنشی تکثیر شده بر روی ژل آگاروز در ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه بررسی شد. سرانجام محصول PCR توسط شرکت تگ کوپن هاگن[۳] (دانمارک) تعیین توالی شد و توالی به‌دست‌آمده با مقایسه با داده‌های موجود در بانک ژن مرکز NCBI شناسایی شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای عمومی *16S rRNA*

پرایمرها	۵´ توالی ۳´
FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGC
RP1	CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACG

جدول ۲- مراحل انجام PCR

چرخه	مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد چرخه‌ها
اول	واسرشتگی ابتدایی ژنوم	۹۴	۳ دقیقه	۱
دوم	واسرشتگی ژنوم	۹۴	۱ دقیقه	۳۰
	اتصال	۶۴	۳۰ ثانیه	
	گسترش	۷۲	۲ دقیقه	
سوم	گسترش نهایی	۷۲	۲۰ دقیقه	۱

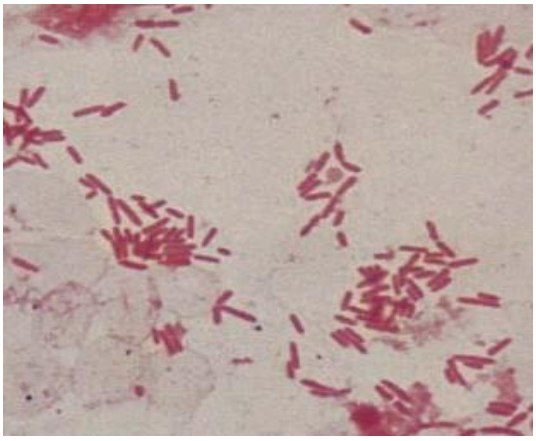
طراحی آزمایش و بهینه‌سازی فرآیند سنتز PHA: براساس بازده تولیدPHA، بهترین جدایه انتخاب شد و شرایط بهینه به منظور تولید PHA برای آن بررسی شد. برای این منظور شرایط بهینه رشد جدایه منتخب از نظر اسیدیته (۴، ۷، ۱۰ و ۱۱) و دمای انکوباسیون (۲۵، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد (۱۲) و منحنی رشد باکتری در این شرایط به منظور بررسی میزان سنتز PHA در فازهای مختلف رشد در مدت زمان ۱۱ ساعت در طول موج ۶۵۰ نانومتر ترسیم شد. سپس از پساب نفتی و آمونیاک به ترتیب به عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده شد و غلظت بهینه این ترکیب برای رشد سویه برتر به‌دست آمد. به‌منظور پی‌بردن به غلظت بهینه منابع کربن و نیتروژن غلظت‌های ۹، ۱۰ و ۱۰/۵ گرم بر لیتر گلوکز و ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم استفاده شد (۱۳ و ۱۴). بدین صورت که با ثابت نگه داشتن یک عامل، غلظت‌های مختلف عامل دوم بررسی و سپس اثر متقابل غلظت دو منبع نیتروژن و کربن بر رشد باکتری سنجیده شد. در این شرایط رشد جدایه MIS-1 به مدت ۱۱ ساعت بررسی شده و منحنی آن ترسیم شد.

تحلیل آماری: با استفاده از آزمون‌های آماری تجزیه واریانس (ANOVA) و دانکن (Duncan) اختلاف میانگین‌ها از نظر معنادار بودن یا نبودن بررسی شد.

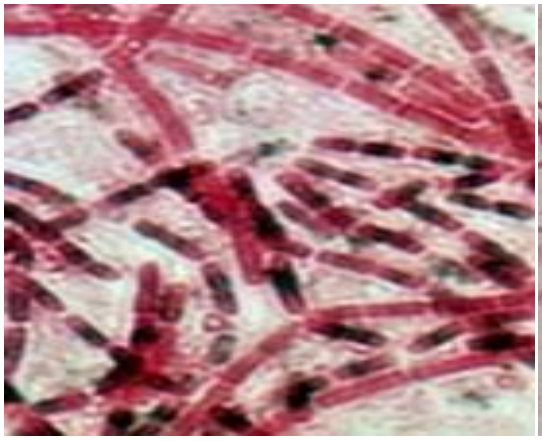
نتایج

جداسازی و رنگ آمیزی باکتری‌ها: در غربال‌گری اولیه و کشت نمونه‌ها در محیط پایه MSM، ۱۶ جدایه باکتریایی رشد کرد. این جدایه‌ها تحت رنگ آمیزی سودان سیاه قرار گرفتند و از بین آن‌ها ۱۱ جدایه تولید کننده PHA تشخیص داده شد. شکل‌های ۱ و ۲ نتایج رنگ‌آمیزی گرم و سودان سیاه جدایه MIS-1 را نشان می‌دهند.

تعیین میزان درصد تولید PHA: درصد PHA تولید شده توسط جدایه‌ها با روش سدیم هیپوکلریت و کلروفرم مطابق با جدول ۳ تعیین شد.



شکل۱- رنگ آمیزی گرم جدایهMIS-1



شکل۲- رنگ آمیزی سودان سیاه جدایه MIS-1

جدول ۳- میانگین PHA تولید شده (گرم/جرم بیومس) توسط جدایه‌های باکتریایی

سویه	MIS-1	MIS-2	MIS-3	MIS-4	MIS-5	MIS-6	MIS-7	MIS-8	MIS-9	MIS-10	MIS-11
میزان درصد PHA تولید شده	۵۸/۵۲۲	۵۷/۸۹۱	۴۱/۵۵۳	۴۹/۷۰۱	۴۹/۶۱۲	۵۰/۶۵۰	۵۶/۳۳۲	۵۲/۰۸۶	۵۲/۷۳۳	۴۰/۰۱۶	۵۳/۷۰۳

با توجه به جدول بالا سویه MIS-1 با تولید PHA معادل ۵۸/۵۲۲ درصد وزن خشک سلولی بالاترین بازده تولید PHA را دارد. میانگین تولید PHA توسط این سویه اختلاف معناداری را در سطح ۵ درصد آزمون دانکن با سایر سویه‌ها نشان داد.

نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی: آزمون‌های فنوتیپی، معرف باکتری با کلونی شیری رنگ، سطح صاف، حاشیه کامل، محدب و گرد، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، متحرک، ایندول منفی، مانیتول منفی و اکسیداتیو بود که نشان دهنده گونه‌ای از جنس *Pseudomonas* است.

نتایج آزمون‌های مولکولی: نتایج تحلیل BLASTn با مقایسه توالی DNA جدایه مورد بررسی (جدول ۴) با توالی‌های موجود در بانک ژنی جهانی، این جدایه را با ۹۵ درصد شباهت سویه‌ای از گونه *Pseudomonas aeruginosa* تشخیص داد و سویه MIS-1 نام گرفت (جدول ۵). شکل ۳ فرآورده ۱۵۰۰bp حاصل از تکثیر این ژن را نشان می‌دهد.

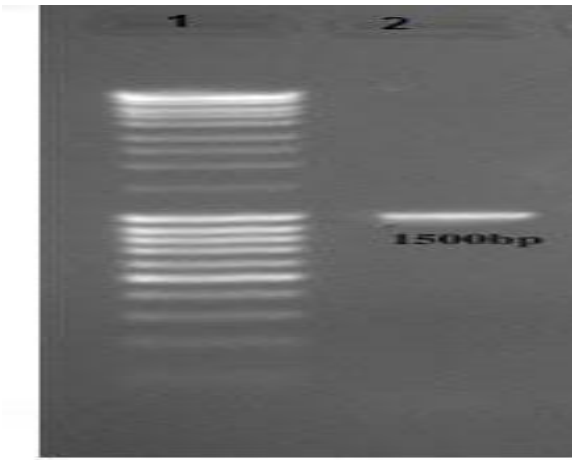
منحنی رشد جدایه MIS-1 (شکل ۴) در طول موج ۶۵۰ نانومتر نشان داد که این باکتری با فاز تاخیری ۴ ساعته شروع به رشد کرده و طی ساعت های ۴ تا ۸ از منحنی رشد به حد اکثر رشد خود رسیده است و سپس، تا ساعت دهم وارد فاز سکون شد و در این فاز باقی می‌ماند. این منحنی رشد مربوط به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷، ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز به عنوان منبع کربن و ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن است که همان شرایط بهینه است.

جدول ۴- توالی ژنی جدایه مورد بررسی

CTCACCTGATCACCCTGGTCATCAAGCAGCAGAGCGACGCTCAGGCACGCCAACTCATGGACCAGGAAGTT

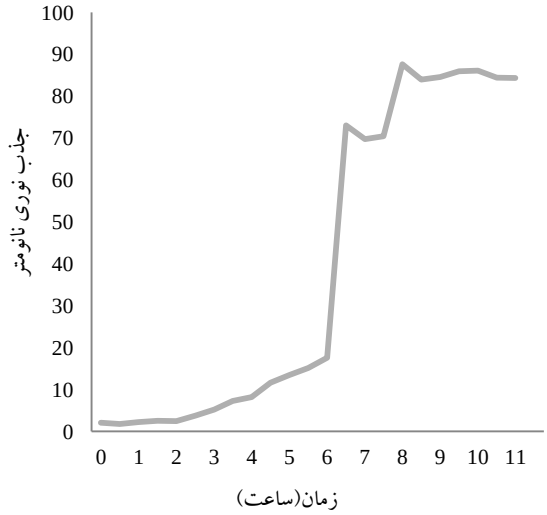
جدول ۵- نتیجه بلاست ژنوم *16S rRNA* تکثیر یافته جدایه MIS-1 پس از تعیین توالی

Accession	Description	Max score	Total score	Query converting	E value	Max ident
CP-006853. 1	*Pseudomonas aeruginosa* strain MTB-1	۱۰۶	۱۰۶	۹۲	۰/۰	٪۹۵



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR جدایه MIS-1

۱: مارکر (وزن مولکولی ۱ kb) ۲: فرآورده حاصل از تکثیر ناحیه *16S rRNA*



شکل ۴- منحنی رشد جدایه MIS-1 در مدت ۱۱ ساعت

نتایج بهینه‌سازی دما و اسیدیته (جدول ۶) و به‌علاوه نوع منابع کربن و نیتروژن (جدول ۷) و غلظت این منابع (جدول‌های ۸ و ۹) نشان داد که *Pseudomonas aeruginosa* سویه MIS-1 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷، غلظت بالای منبع کربن و غلظت پایین منبع نیتروژن و استفاده از گلوکز و سولفات آمونیوم به ترتیب به عنوان منابع کربن و نیتروژن، مطابق با محیط MSM (یعنی ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم)، بالاترین میزان PHA خود را که معادل ۵۸/۵۲۲ درصد وزن خشک سلولی است (نسبت به سایر متغیرها) سنتز می‌کند. بررسی منحنی رشد این باکتری در این دو محدوده دمایی و اسیدیته نشان داد که باکتری در شرایط یاد شده مدت زمان بیشتری در فاز ایستا در مقایسه با دمای ۲۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۴ و ۱۰ باقی ماند (شکل ۵). به‌علاوه در تمام موارد یاد شده آزمون دانکن اختلاف معناداری را در سطح ۵ درصد بین میانگین‌ها نشان داد.

جدول ۶- بهینه‌سازی اسیدیته و دما برای جدایه MIS-1 از نظر درصد تولید PHA

	دمای ۲۵	دمای ۳۷	دمای ۴۲	اسیدیته ۴	اسیدیته ۷	اسیدیته ۱۰
درصد PHA تولیدی	۴۴/۹۰۳	۵۸/۵۲۲	۴۱/۱۲۰	۳۶/۸۱۲	۵۸/۵۲۲	۴۱/۰۰۶

جدول ۷- نتایج بهینه‌سازی منابع کربن و نیتروژن به روش تک عاملی برای سنتز PHA توسط جدایه MIS-1

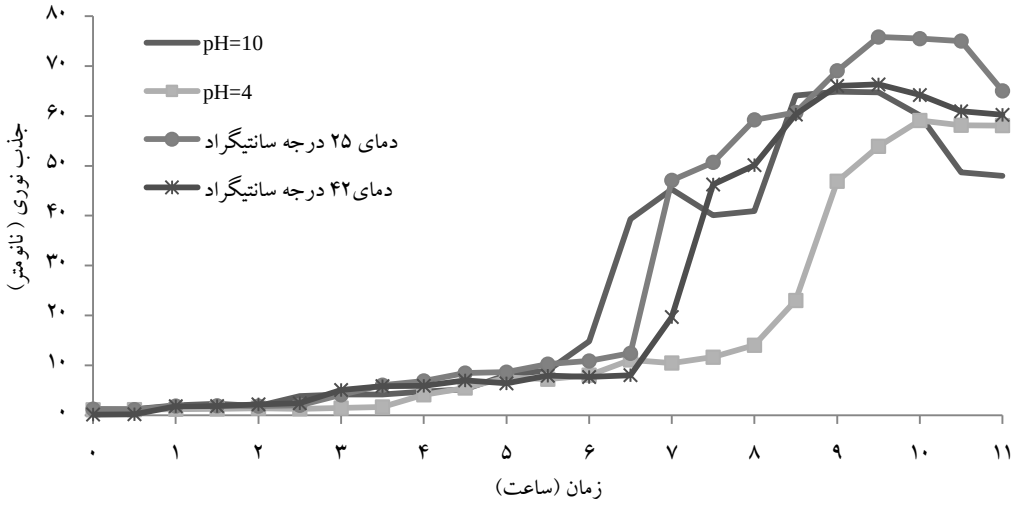
متغیرها	نوع منبع	درصد PHA سنتز شده
منبع کربن و نیتروژن (محیط MSM)	گلوکز و سولفات آمونیوم	۵۸/۵۲۲
منبع کربن	پساب نفتی و سولفات آمونیوم	۵۷/۰۳۵
منبع نیتروژن	آمونیاک و گلوکز	۳۶/۱۰۳
منبع کربن و نیتروژن	پساب نفتی و آمونیاک	۵۰/۷۳۰

جدول ۸- نتایج بهینه‌سازی غلظت منابع کربن و نیتروژن برای سنتز PHA توسط جدایه MIS۱-

		غلظت منابع (گرم بر لیتر)	میزان PHAسنتز شده (درصد)
منبع کربن	گلوکز	۹	۴۶/۵۵۶
		۱۰	۵۸/۵۲۲
		۱۰/۵	۶۳/۰۱۳
منبع نیتروژن	سولفات آمونیوم	۰/۲	۵۷/۴۱۷
		۰/۵	۵۸/۵۲۲
		۰/۷	۵۳/۰۶۱

جدول ۹- نتایج بهینه‌سازی غلظت منابع کربن و نیتروژن به روش دو عاملی برای سنتز PHA توسط جدایه MIS-1

نوع منبع	غلظت	درصدPHAسنتز شده
گلوکز	۹	۳۶/۱۲
سولفات آمونیوم	۰/۷	
گلوکز	۱۰/۵	۴۸/۴۰
سولفات آمونیوم	۰/۲	
گلوکز	۹	۲۵/۱۰
سولفات آمونیوم	۰/۲	
گلوکز	۱۰/۵	۴۱/۹۵
سولفات آمونیوم	۰/۷	



شکل ۵- منحنی رشد جدایه MIS-1 در شرایط بهینه‌سازی دما و اسیدیته به مدت ۱۱ ساعت

بحث و نتیجه‌گیری

مسجدسلیمان واقع در شمال شرقی خوزستان، نخستین منطقه نفتی ایران است و دارای چاه‌های مهار شده بسیاری است. آلودگی‌های نفتی بسیاری در خاک اطراف و در مجاورت این مکان‌ها مشاهده می‌شود. به‌همین علت در این پژوهش، از خاک چهار ناحیه آلوده به نفت مسجدسلیمان نمونه‌برداری شد.

در نتیجه غربال‌گری خاک‌های آلوده به نفت منطقه مسجدسلیمان سویه‌های تولیدکننده PHA که تولیدکنندگان مناسبی بودند جداسازی شد. به‌علت این‌که آلودگی نفتی از مدت‌ها قبل در این ناحیه وجود داشته و نسبت کربن به نیتروژن در خاک این منطقه افزایش بیش از حدی داشته است (۶)، زمینه رشد باکتری‌ها فراهم نشده و در نتیجه سویه‌های انتخاب شده توانایی استفاده از کربن و ذخیره‌سازی آن به فرم PHA را دارند. مطالعات دیگر پژوهشگران نیز نشان می‌دهد که نواحی آلوده به نفت از مکان‌های مناسبی برای کلونیزه‌شدن و تکثیر باکتری‌های مولد PHA هستند. چی[۴] و همکاران با بررسی خاک‌های آلوده نفتی حاشیه ریل راه‌آهن دریافتند که باکتری‌های موجود در این خاک‌ها قادر به سنتز PHA هستند و *سودوموناس* را در زمره این باکتری‌ها نام بردند (۱۵). نیر و اندا[۵] نیز بستر نفتی را به عنوان بستر مناسب برای سنتز PHA توسط باکتری معرفی کردند (۱۱). دانشی[۶] و همکاران پی‌بردند که باکتری *Cupriavidus necator* در محیط ارزان قیمت عصاره ذرت قادر به سنتز PHA است (۱۶). ماتسوموتو[۷] و همکاران طی بررسی توانایی تولید PHA توسط *Cupriavidus* sp. USMAA ۲-۴ در بسترهای ارزان قیمت پی بردند این باکتری در محیط حاوی روغن نخل خرما می‌تواند PHA را سنتز کند (۱۷). به‌علاوه تیرومالا و ردی[۸] طی استفاده از لجن فعال به عنوان محیط کشت ارزان قیمت نشان دادند *Bacillus* sp در این محیط قادر به سنتز PHA خواهد بود (۱۸).

در پژوهش جاری بر اساس رنگ آمیزی سودان سیاه و آزمون تعیین درصد PHA تولیدی توسط روش سدیم هیپوکلریت و کلروفرم، جدایه MIS-1 با تولید ۵۸/۵۲۲ درصد PHA، بالاترین درصد را در بین سایر سویه‌ها

دارا بود. چن[۹] و همکاران نیز از روش یاد شده استفاده و ۳۲ جدایه را شناسایی کردند که قادر به سنتز PHA بودند. بالاترین میزان سنتز PHA در بین این جدایه‌ها ۷۴/۶۳ درصد وزن خشک سلول به‌دست آمد (۱۹). کاست[۱۰] با بهره گیری از لجن فعال، زباله‌های تخمیری و روغن‌های سرخ کردنی نشان داد که *سودوموناس آئروژینوزا* در این بسترها قادر است ۵۳/۵۷۱ درصد PHA سنتز کند (۲۰).

مطالعه حاضر نخستین مطالعه در منطقه آلوده به نفت مسجدسلیمان است که به جداسازی باکتری‌های مولد PHA پرداخته و *سودوموناس آئروژینوزا* سویه MIS-1 نخستین جدایه تولیدکننده قوی PHA گزارش‌شده از این منطقه است.

سیهان و ازدمیر[۱۱] نشان دادند که *Enterobacter aerogenes* Bi 12 در بستری از فاضلاب خانگی در بازه زمانی ۱۸ ساعت، می‌تواند ۱۶/۶۶ تا ۹۶/۲۵ درصد PHA را سنتز کند (۲۱). بررسی حاضر نشان می‌دهد که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* قادر به سنتز PHA در خاک آلوده به نفت بوده و می‌تواند در خاک آلوده به نفت مسجدسلیمان تا ۵۸/۵۲۲ درصد وزن خشک خود PHA سنتز کند. وانگ و نومورا[۱۲] بیان کردند که *Pseudomonas putida* KT2442 و همچنین، *Pseudomonas aeroginosa* دارای واحد تنظیمی خاصی هستند که آن‌ها را قادر به استفاده از گلیسرول به عنوان منبع کربن نموده و تا ۸۰ درصد وزن خشک خودPHA تولید می‌کنند (۲۲). منحنی رشد جدایه MIS-1 نشان داد که این جدایه سنتز PHA را در فاز لگاریتمی آغاز می‌کند و حداکثر فعالیت آن در فاز ایستا مشاهده می‌شود. این نتایج با نتایج بیشتر مطالعات مطابقت دارد. هوک[۱۳] سویه‌های سنتزکننده PHA را جدا کرد که مشابه سویه MIS-1 در فاز ایستا حداکثر میزان PHA را سنتز می‌کرد (۲۳). جیانگ[۱۴] و همکاران با بررسی بر روی تولید مقادیر بالایی از PHA توسط *Pseudomonas fluorescens* سویه A2a5 از سوبسترای ارزان قیمت نظیر عصاره نیشکر، از دامنه دمایی ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند و دمای بین ۲۰ تا۲۵ درجه سانتی‌گراد را به‌عنوان دمای بهینه به‌کار بردند (۲۴). وانگ و نومورا دریافتند دمای بهینه رشد برای *Pseudomonas putida* KT2440، ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (۲۲). وانگ و همکاران با بررسی بر روی توانایی و میزان سنتز PHA توسط *Pseudomonas putida KT2442* به این نتیجه رسیدند که از بین سه دمای ۲۵، ۳۰ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، این باکتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد حداکثر میزان PHA را تولید می‌کند و این دما را به‌عنوان دمای بهینه لحاظ کردند (۲۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد دما و اسیدیته دو عامل مهم و تاثیرگذار در امر سنتز PHA در سویهMIS-1 است. در بهینه‌سازی دما و اسیدیته، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۷ بهترین شرایط برای رشد جدایه منتخب تشخیص داده شد. با تغییر این دو عامل نتایجی متفاوت با نتیجه آزمایش در شرایط بهینه حاصل شد که به مراتب تولید PHA کمتر بود. برای بهینه‌سازی منابع کربن و نیتروژن، پساب نفتی به عنوان منبع کربن جایگزین گلوکز و آمونیاک به‌عنوان منبع نیتروژن جایگزین سولفات آمونیوم در تولید PHA شد. این بررسی به صورت یک عاملی و دو عاملی انجام شد که طی آن با تغییر هریک از متغیرها میزان PHA سنتز شده سنجیده شد. نتایج نشان داد، زمانی‌که از پساب نفتی به عنوان منبع کربن استفاده شد بدون تغییر در منبع نیتروژن موجود در محیط کشت حداقل نمکی، سویه

MIS-1 توانست حداکثر میزان PHA را سنتز کند. هنگامی‌که از آمونیاک به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد، میزان PHA سنتز شده در این جدایه کاهش چشم‌گیری را نشان داد. به‌علاوه تغییر هم‌زمان این دو منبع نیز نشان داد که گلوکز و سولفات آمونیوم منابع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید PHA توسط این باکتری هستند.

امیرلو[۱۵] و همکاران طی بررسی بر روی توانایی سنتز PHA توسط باکتری *Cupriavidus* سویه USMAA39-9 به این نتیجه رسیدند که از بین محیط‌هایی که بوتیرولاکتون به همراه ۱و ۴ بوتان دیول، اسید اولئیک به همراه ۱– پنتانول، اسید اولئیک به همراه ۱- پنتانول، ۱ و ۴ بوتان دیول به همراه ۱- پنتانول هر کدام به عنوان منبع کربن استفاده کردند، بالاترین درصد PHA زمانی سنتز می‌شود که ۱ و ۴ بوتان دیول و ۱- پنتانول تواما به عنوان منبع کربن استفاده شده باشند (۲۶). افزون بر این، زو[۱۶] و همکاران به منظور بهینه‌سازی شرایط سنتز PHAتوسط *Burkholderia sepacia* ATCC17759 از منابع کربن گزیلوز، لاکتوز، گلوکز و گلیسرول استفاده کردند و در هر مرحله با درصد متفاوتی از PHA تولیدی مواجه شدند و در نهایت، به این نتیجه رسیدند که در محیطی که گلیسرول به عنوان منبع کربن استفاده شد این سویه باکتری توانست حداکثر میزان PHA را سنتز کند (۲۷). یانگ[۱۷] و همکاران به منظور بهینه‌سازی منبع کربن از استات، پروپیونات و بوتیرات استفاده کردند و درصد PHA تولیدی در هر یک از محیط‌ها را سنجیدند و به این نتیجه رسیدند که در محیط حاوی بوتیرات حداکثر میزان PHA سنتز شد (۱). بررسی حاضر نشان می‌دهد که بهینه‌سازی منابع کربن و نیتروژن می‌تواند بر میزان سنتز PHA در باکتری‌های مختلف از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از خاک آلوده به نفت اثر مستقیمی را بر جای بگذارد که در باکتری‌های مختلف بر اساس نوع منبع می‌تواند باعث کاهش و یا افزایش سنتز PHA شود. وانگ و همکاران طی پژوهش روی *باکتری Pseudomonas putida* و تولید PHA بر روی محیط حاوی هپتانوات به عنوان منبع کربن توسط این باکتری به این نتیجه رسیدند که هنگامی که مقدار هپتانوات ۱۰ گرم بر لیتر باشد ۵۳ درصد PHA و هنگامی که مقدار هپتانوات به کار رفته در محیط کشت باکتری ۵/۸ گرم بر لیتر باشد ۳۷ درصد PHA سنتز خواهد شد که خود حاکی از تاثیر گذاری غلظت منبع کربن بر سنتز PHA است (۲۵). کیم‌دو[۱۸] و همکاران طی بررسی تاثیرگذاری غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن در باکتری *Pseudomonas putida KTMQ01*، این منبع کربن را در دو غلظت ۱/۲۶ و ۲/۷ گرم به کار بردند و ثابت کردند هنگامی این باکتری قادر است مقدار بیشتری PHA را سنتز کند که غلظت بیشتری از گلوکز در محیط کشت آن موجود باشد (۲۸). در بررسی حاضر با افزایش و کاهش دادن منابع کربن و نیتروژن بهینه، میزان PHA سنتزشده با میزان سنتز بهینه سنجیده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نتایج نشان داد که سویهMIS-1، با افزایش غلظت گلوکز و کاهش میزان سولفات آمونیوم به طور جداگانه و توام، میزان درصد PHA بالاتری را سنتز می‌کند. از این رو برای افزایش بازدهی PHA در این باکتری‌ها می‌توان غلظت منبع کربن را افزایش و غلظت منبع نیتروژن را تا حد معینی کاهش داد. اگر افزایش یا کاهش از حد معینی تجاوز کند انتظار می‌رود میزان سنتز PHA کاهش یابد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که

خاک‌های آلوده به نفت به علت عدم توازن نسبت کربن به نیتروژن یک شرایط انتخابی برای غنی‌سازی باکتری‌های مولد PHA هستند. بنابراین، پژوهش در خصوص جداسازی باکتری‌های مولد PHA از این مناطق می‌تواند به نتایج ارزشمند و در خور توجهی بیانجامد. باکتری *Pseudomonas aeruginosa MIS-1* جداشده در این پژوهش با بازده ۵۸/۵۲۲ درصد تولید PHA توانست در حضور منابع کربن و نیتروژن ارزان قیمت و در دسترس یعنی گلوکز و سولفات آمونیوم، مقدار قابل توجهی از این پلیمر تجزیه‌پذیر زیستی را تولید کند. به این ترتیب می‌تواند موجب کاهش آلودگی محیط زیست و تبدیل آلاینده‌های نفتی به ترکیبات با ارزش افزوده و سازگار با محیط زیست شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های اجرایی و مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Yang YH., Brigham CJ., Budde CF., Boccazzi P., Willis LB., Hassan MA., et al. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87 (6): 2037- 45.

(2) Santhanan A., Sasidharam S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Alcaligenes* app. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9 (21): 3144- 50.

(3) Razzaq A., Jamil N., Naheed N., Hasnain S. Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9 (13): 1919- 25.

(4) McCool GJ., Cannon MC. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 2001; 183 (14): 4235- 43.

(5) Liu HY., Hall PV., Darby J., Coats ER., Green PG., Thampson DE., et al. Production of polyhydroxyalkanoate during treatment of tomato cannery wastewater. *Water Environment Research* 2008; 80 (4): 367- 37.

(6) Salam LB., Obayori OS., Akashoro OS., Okogie GO. Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *International Journal of Agriculture and Biology* 2011; 13 (2): 245- 50.

(7) Aslani MM. *Staining methods in microbiology*. Tehran: Noor-e- Danesh Press; 2004.

(8) Salmiati UZ., Salim MR., Olsson G. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification. In: Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA) -ASPIRE Conference and Exhibition, Taiwan; 2009.

(9) Arshad MU., Jamil N., Naheed N., Hasnain S. Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. *African Journal of Biotechnology* 2007; 6 (9): 1115- 21.

(10) Dalton DA., Ma C., Shrestha S., Kitin P., Strauss SH. Trade-offs between biomass growth and inducible biosynthesis of polyhydroxybutyrate in transgenic poplar. *Plant Biotechnology Journal* 2011; 9 (7): 759- 67.

(11) Nair J., Anda M. *Biodegradability of "Bebak bag" An alternative to non degradable "Green bags"*. Report for Eerthbags Australia Pty Ltd. 2010, 1- 19.

(12) Yakimov MM., Timmis KN., Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18 (3): 257- 66.

(13) da Silva GP., Mack M., Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 2009; 27 (1): 30- 9.

(14) Shukla P., Patel N., Rao RM., Shukla J., Verma S., Jha S., et al. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoate and exopolysaccharide producing *Bacillus* sp. PS1 isolated from sugarcane field in Bhilai, India. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 2011; 3 (2): 33- 5.

(15) Chee JY., Yoga SS., Lau NS., Ling SC., Abed RMM., Sudesh K. Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnolo*gy 2010; 2: 1395- 1404.

(16) Daneshi A., Younesi H., Ghasempouri SM., Sharifzadeh M. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of biomass yield and volumetric productivity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2010; 85 (11): 1528- 39.

(17) Matsumoto K., Morimoto K., Gohda A., Shimada H., Taguchi S. Improved polyhydroxybutyrate (PHB) production in transgenic tobacco by enhancing translation efficiency of bacterial PHB biosynthetic genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011: 111 (4): 485- 8

(18) Thirumala M., Reddy SV. Production of polyhydroxybutyrate using cane molasses as a sole carbon substrate by *Bacillus* sp. 112A. *The IUP Journal of Biotechnology* 2012; 6 (1): 25- 33.

(19) Chen J., Zhang L., Chen J., Chen G. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Copolyesters in *Ralstonia eutropha* PHB－4 Harboring a Low-Substrate-Specificity PHA Synthase PhaC2Ps from Pseudomonas stutzeri 1317. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2007; 15 (3): 391- 6.

(20) Coats ER., Loge FJ., Wolcott MP., Englund K., McDonald AG. Synthesis of polyhydroxyalkanoates in municipal wastewater treatment. *Water Environment Research* 2007; 79 (12): 2396- 403.

(21) Ceyhan N., Ozdemir G. Pol-β-yhydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes* 12Bi strain. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (6): 690-702.

(22) Wang Q., Nomura CT. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2010; 110 (6): 653- 59.

(23) Heok YK. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by a locally isolated *Chromobacterium* sp. USM2 [Dissertation]. Malaysia: University Sains Malaysia. ; 2009.

(24) Jiang Y., Song X., Gong L., Li P., Dai C., Shao W. High poly (β-hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology* 2008; 42 (2): 167- 72

(25) Wang PP., Li XT., Chen GQ. Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a fadBA knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442. *Process Biochemistry* 2009; 44: 106- 11

(26) Amirlu A., Syairah SN., Yahya ARM., Azizan MNM., Majid MIA. Synthesis of biodegradable polyesters by Gram negative bacterium isolated from Malaysian environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24: 1327- 32.

(27) Zhu C., Nomura CT., Perrotta JA., Stipanovic AJ., Nakas JP. Production and characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Biotechnology Progress* 2010; 26 (2): 424- 30.

(28) Kim do Y., Kim HW., Chung MG., Rhee YH. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology* 2007; 45 (2): 87- 97.

[1]- Polyhydroxyalkanoate
[2]- Mineral salt medium (MSM)
[3]- TAG copenhagen
[4]- Chee
[5]- Nair and Anda
[6]- Daneshi
[7]- Matsumoto
[8]- Thirumala and Reddy
[9]- Chen
[10]- Coast
[11]- Ceyhan and Ozdemir
[12]- Wang and Nomura
[13]- Heok
[14]- Jiang
[15]- Amirlu
[16]- Zhu
[17]- Yang
[18]- Kim do

Isolation and identification of PHA producing bacteria from oil contaminanted soils in Masjed Soleiman and optimization of producing conditions

Farshid Kafilzadeh *
Associate Professor of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, kafilzadeh@jia.ac.ir
Armaghan Parto
M.Sc. of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, armaghan.parto@gmail.com
Hossein Motamedi
Associate Professor of Microbiology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran, hhmotamedi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Polyhydroxyalkanoate (PHA) is counted biodegradable polymer, produced by bacteria, which is employed instead of petrochemical plastics, to reduce environment pollution. The purpose of this study is the isolation and identification of the PHA producing bacteria in Masjed-Soleiman oil fields, determination of PHA produced by the bacteria, determine the optimal conditions of temperature, pH, concentration and type of carbon and nitrogen sources on the level of PHA synthesis and the use of waste oil as a cheap substrate of carbon for the synthesis of PHA by isolated bacteria.

Materials and methods: At first 9 samples of soil contaminated with crude oil, from 9 points at 4 well sites in Masjed-Soleiman oil field were taken. The initial screening was done by MSM at the temperature of 28 °C. Isolates from the view point of producing PHA, were confirmed, by using Sudan black stain and were identified by using phenotypical tests and *16S rRNA* sequence determination. Also, optimization of temperature, pH, carbon and nitrogen sources were made for bacteria growth.

Results: In this study eleven isolates were identified as PHA producers and among them the highest range belongs to MIS-1 strain by the range of 58.522 percent of the cellular dry waight, wich produces the maximum PHA. This isolate is recognized as the species of *pseudomonas aeroginosa* according to the phenotypic tests and sequence analysis of *16S rRNA* with 95 % similarity. In addition, the results of optimization tests showed that, the isolates in the temperature of 37 °C, pH7, glucose as the source of carbon and ammonium sulphate as the source of nitrogen and finally, concentration of 10 g/lit of the carbon source and 0.5 g/lit of nitrogen source, the highest range of PHA was synthesized.

Discussion and conclusion: The results of this research show that the soil polluted with crude oil of Masjed- Soleiman oil field, in long term and also due to high rate of carbon, provides a suitable environment for screening of beneficial bacteria such as PHA producing bacteria.

Key words: Polyhydroxyalkanoate (PHA), Mineral salt medium (MSM), *Pseudomonas aeruginosa*, Masjed Soleiman

* Corresponding author
Received: January 27, 2014 / **Accepted:** March 15, 2014